

BARTOSZ SOŁOWIEJ, WALDEMAR GUSTAW, PAWEŁ GLIBOWSKI,
DOMINIK SZWAJGIER, TOMASZ CZERNECKI

WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE ORAZ STRUKTURA POLIMERÓW IZOLATU BIAŁEK SERWATKOWYCH

Streszczenie

Jedną z najważniejszych właściwości białek serwatkowych jest zdolność do tworzenia żeli. Na zachowanie białek w roztworze wodnym wpływa wartość pH, moc jonowa roztworu, temperatura, czas ogrzewania oraz stężenie samego białka.

Celem badań było określenie wpływu metody ogrzewania, stężenia chlorku sodu i chlorku wapnia na właściwości reologiczne i strukturę polimerów izolatu białek serwatkowych. Stosowano dwie metody ogrzewania roztworów izolatu białek serwatkowych (WPI). Pojedyncze ogrzewanie prowadzono przy pH 7,0 w temp. 80°C przez 30 min., zaś podwójne najpierw przy pH 8,0, a następnie po ochłodzeniu do 21°C ustalano pH na poziomie 7,0 i ponownie ogrzewano w temp. 80°C przez 30 min. Określano właściwości reologiczne otrzymanych polimerów, a także analizowano te związki z wykorzystaniem HPLC.

Ustalono, że twardość żeli rosła wraz ze wzrostem stężenia jonów metali. W przypadku dodatku chlorku sodu, najwyższy wzrost wartości modułu zachowawczego obserwowano w dyspersji o stężeniu soli 120 mM, zaś 15 mM w przypadku chlorku wapnia. W rozdzielach chromatograficznych wykazano, że dodatek soli wpływał na większy stopień spolimeryzowania białek serwatkowych.

Słowa kluczowe: białka serwatkowe, reologia, polimeryzacja, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Wprowadzenie

Białka serwatkowe charakteryzują się wysoką wartością odżywczą, są źródłem aminokwasów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania i wzrostu organizmu, stanowią także źródło energii. Z uwagi na korzystne właściwości funkcjonalne, takie jak: rozpuszczalność, zdolność wiązania wody, właściwości pianotwórcze, emulgujące i żelujące oraz ze względu na bardzo dobrą przyswajalność przez organizm ludzki, znalazły one szerokie zastosowanie jako dodatek do wzbogacania i uszlachetniania

Mgr inż. B. Sołowiej, dr inż. W. Gustaw, dr inż. P. Glibowski, dr inż. D. Sz wajgier, mgr inż. T. Czernecki, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Akademia Rolnicza, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

produktów żywnościowych. Białka serwatkowe odznaczają się właściwościami fizjologicznymi, odżywczymi i funkcjonalnymi [10].

Głównymi białkami serwatkowymi są α -laktoalbumina (α -la), β -laktoglobulina (β -lg), albumina wołowa serum (BSA) i immunoglobuliny (Ig). W skład białek serwatkowych mogą wchodzić fragmenty β -kazeiny (dawniej zwane proteozo-peptonami) i κ -kazeiny (glikomakropeptyd), laktoferyna, lizozym i laktoperoksydaza oraz białka membranowe [11]. β -lg występuje w postaci wielu genetycznych wariantów (A, B, C, D, Dr, E, F, G, H, I, J i W) [4]. Wariant β -lg J wcześniej był oznaczony jako X [2]. Warianty A i B β -lg w sposób istotny wpływają na właściwości mleka [4]. W przypadku α -la wyróżnia się warianty A, B i C; α -la nie jest tylko źródłem białka w mleku, lecz pełni również funkcję regulatora produkcji laktozy [4].

Jedną z najważniejszych właściwości białek serwatkowych jest zdolność do tworzenia żeli. Na zachowanie białek w roztworze wodnym wpływa wiele czynników fizykochemicznych: pH, moc jonowa roztworu, temperatura, czas ogrzewania oraz stężenie samego białka [5, 12]. Czynniki te mają wpływ na wiązania, jakie powstają w roztworze białek. β -lg w decydujący sposób wpływa na żelowanie preparatów białek serwatkowych. Mechanizm żelowania β -laktoglobuliny pod wpływem ogrzewania jest relatywnie najlepiej poznany [18]. W neutralnym pH i temp. pokojowej β -lg występuje głównie w postaci dimeru. Po ogrzaniu do temp. 70°C dimery β -lg dysocjują do monomerów [7] częściowo rozfałdowanych [16]. Zmiany te prowadzą do wyeksponowania grup hydrofobowych [17] i wolnej grupy sulfhydrylowej [15], co skutkuje powstaniem reaktywnego monomeru.

Celem badań było określenie wpływu metody ogrzewania, stężenia chlorku sodu i chlorku wapnia na właściwości reologiczne i strukturę polimerów izolatu białek serwatkowych.

Material i metody badań

Do badań użyto izolatu białek serwatkowych (whey protein isolate-WPI) o zawartości białka 93,6% (m/m), produkcji (DAVISCO Food Ingredients International; Le Sueur, MN, USA); NaCl, CaCl₂, NaOH produkcji P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne w Gliwicach; wzorce mas cząsteczkowych (β -laktoglobuliny, α -laktoalbuminy, BSA) produkcji Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Zawartość białka oznaczano metodą Kjejdahla [1].

*Otrzymywanie polimerów/agregatów białek serwatkowych**Pojedyncze ogrzewanie*

Roztwory białek serwatkowych o pożądanym 8% stężeniu białka otrzymywano przez jednogodzinne mieszanie WPI z wodą destylowaną w temp. 21°C przy użyciu mieszadła magnetycznego Heidolph MR 3002 (Schwabach, Niemcy) przez 2 godz. przy 300 obr./min. Ustalano pH próbki na poziomie 7,0 za pomocą 1M NaOH. Próbki ogrzewano w temp. 80°C przez 30 min, a następnie chłodzono do temp. 21°C. Otrzymany roztwór spolimeryzowanych białek serwatkowych dalej określano jako sh WPI (single heated whey protein isolate) lub sh (single heated).

Podwójne ogrzewanie

Roztwory białek serwatkowych otrzymywano jak wyżej. Następnie ustalano pH próbki na poziomie 8,0 za pomocą 1M NaOH. Próbki ogrzewano w temp. 80°C przez 30 min. Następnie po ochłodzeniu do 21°C i ustaleniu pH na poziomie 7,0 przy użyciu 1M HCl roztwory ponownie ogrzewano w temp. 80°C przez 30 min, a następnie chłodzono do 21°C. Otrzymany roztwór spolimeryzowanych białek serwatkowych dalej określano jako dh WPI (double heated whey protein isolate) lub dh (double heated).

Dodatek soli

Do otrzymanych spolimeryzowanych białek serwatkowych dodawano bezpośrednio odpowiednio stężony roztwór chlorku sodu lub chlorku wapnia i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego, tak aby uzyskać końcowe stężenie od 60 do 240 mM w pierwszym przypadku i od 5 do 15 mM w drugim przypadku i jednocześnie otrzymać pożądaną 8% stężenie białka. Roztwory chlorku sodu i chlorku wapnia dodawano bardzo powoli, kroplami. Układy te żelowały dopiero podczas przetrzymywania w niskiej temperaturze przy pomiarach na reometrze oscylacyjnym.

Reometria oscylacyjna

W badaniach oscylacyjnych pomiarów dokonywano przy użyciu reometru oscylacyjnego RS 300 (Haake, Karlsruhe, Niemcy) w układzie cylindrów współosiowych (rotor Z 41, cylinder Z 43). Wszystkich badań dokonywano w temp. 5°C po wcześniejszym umieszczeniu płynnego roztworu w cylindrze pomiarowym aparatu i przykryciu go warstwą parafiny. Czas trwania pomiaru wynosił 21 godz. Zmiany wartości modułu zachowawczego określano przy amplitudzie drgań 0,1 Hz, odkształceniu 0,05 w układzie CS, czyli kontrolowanego naprężenia. Wyniki rejestrowano komputerowo, wykorzystując program RheoWin Pro 2.91 (Haake, Karlsruhe, Niemcy).

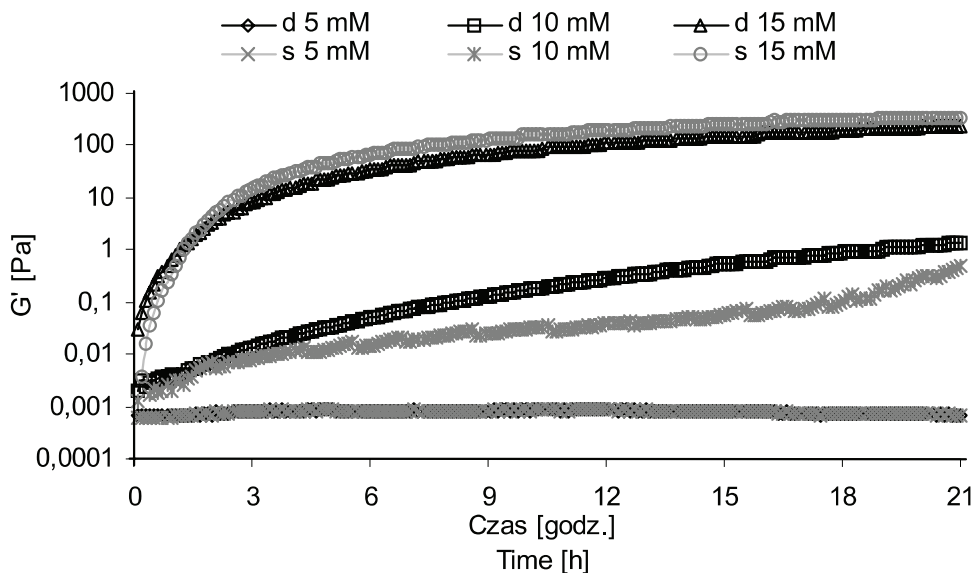
Analiza HPLC

Analizę chromatograficzną prowadzono przy użyciu zestawu chromatograficznego firmy Gilson, z oprogramowaniem Unipoint, składającego się z pompy 306, miksera 811C detektorem 170 DAD i kolumną G4000SW_{XL} z prekolumną TosoHaas (Japonia). Chromatografie wykluczenia na podstawie rozmiarów prowadzono z wykorzystaniem 0,1M roztworu Na₂SO₄ z dodatkiem 0,05% NaN₂ w trybie izokratycznym z szybkością przepływu 0,4 ml/min. Próbki o stężeniu białka 0,1% filtrowano przez filtr 0,45 μm (Millipore, USA). Na kolumnę podawano 20 μl badanej próbki i analizowano ją przy długości fali 280 nm.

Wyniki i dyskusja

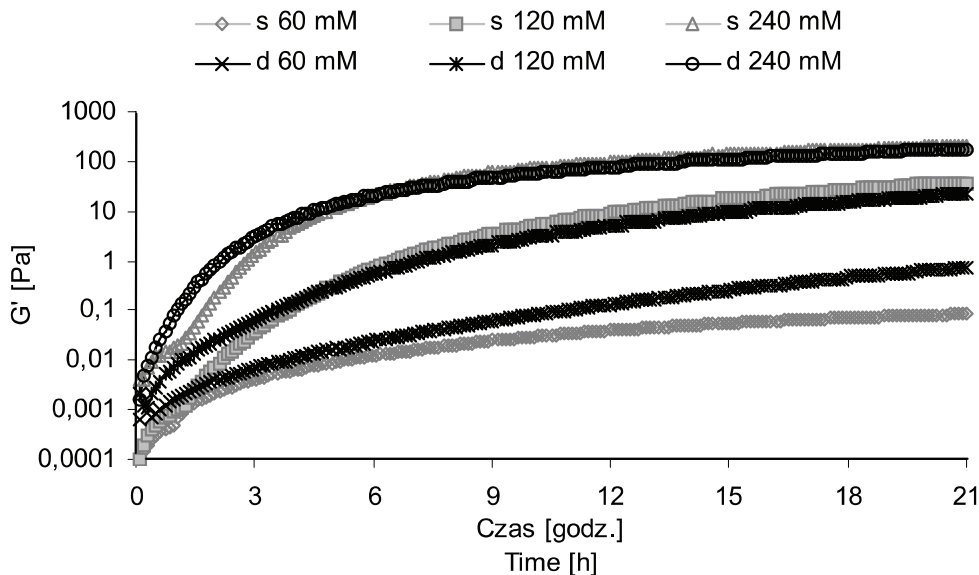
Na rys. 1. i 2. przedstawiono zmiany zachowań reologicznych w zależności od stężenia chlorku wapnia i chlorku sodu. Ustalono, że wraz ze wzrostem stężenia jonów metali twardość żeli rosła. Najwyższy wzrost wartości modułu zachowawczego obserwowano w dyspersjach o stężeniach soli: 120 mM chlorku sodu oraz 15 mM w przypadku chlorku wapnia. Stwierdzono również, że metoda podwójnego ogrzewania powodowała powstawanie żeli twardszych niezależnie od stężenia soli. Mleko i wsp. [13], badając proces podwójnego żelowania białek serwatkowych o zawartości 7% białka, uzyskali wzrost wartości modułu zachowawczego wraz ze wzrostem stężenia chlorku wapnia. Ju i Kilara [9], obserwując proces żelowania na gorąco w obecności 60 mM CaCl₂, odnotowali 18% wzrost sprężystości roztworu WPI wraz z upływem czasu. Barbut i Foegeding [3], stosując zimne żelowanie indukowane jonami wapnia 4% roztworu WPI, również uzyskali znaczący przyrost wartości modułu zachowawczego w czasie.

Na rys. 3. przedstawiono rozdział 0,1% roztworu WPI. Na chromatogramie można wyraźnie rozróżnić najważniejsze białka serwatkowe tj. BSA, β-laktoglobulinę, i α-laktoalbuminę. Poszczególne piki oznaczono poprzez przeprowadzenie analizy wzorców masowych poszczególnych białek serwatkowych. Zastosowanie podwójnej polimeryzacji spowodowało powstanie polimerów/agregatów o dużej masie cząsteczkowej, które były widoczne na chromatogramie po około 9,6 min (pole powierzchni pików ok. 22 mln). Część białek serwatkowych nie utworzyła polimerów/agregatów, co było widoczne w dalszej części krzywej. Podobne rozdziały chromatograficzne uzyskano we wcześniejszych badaniach [8]. Dla porównania wykonano również rozdział białek serwatkowych ogrzewanych jednostopniowo. Otrzymany rozdział jest bardzo podobny jak w przypadku białek poddanych podwójnej polimeryzacji, jednak pik obrazujący polimery/agregaty białek serwatkowych ma dużo większe pole powierzchni (ok. 38 mln), jak również piki pojedynczych białek serwatkowych są dużo słabiej zaznaczone. Może to świadczyć o tym, że podczas jednostopniowej polimeryzacji większa ilość białek serwatkowych uległa polimeryzacji/agregacji.



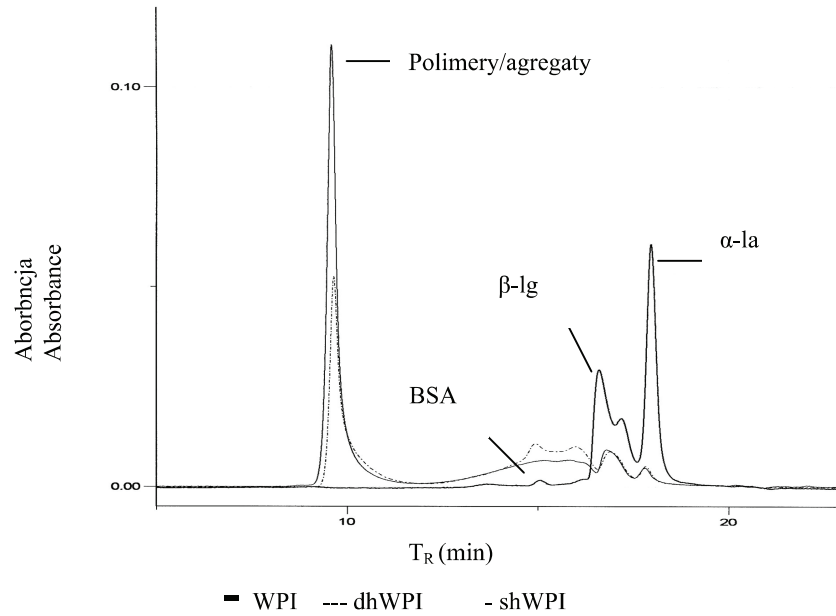
Rys. 1. Zmiany wartości modułu zachowawczego (G') pojedynczo (s) i podwójnie (d) ogrzewanych dyspersji WPI (8% białka) w obecności różnych stężeń chlorku wapnia.

Fig. 1. Changes of preservative modulus values (G') of single (s) and double heated (d) WPI dispersions (8% protein) with calcium chloride added at different concentrations.



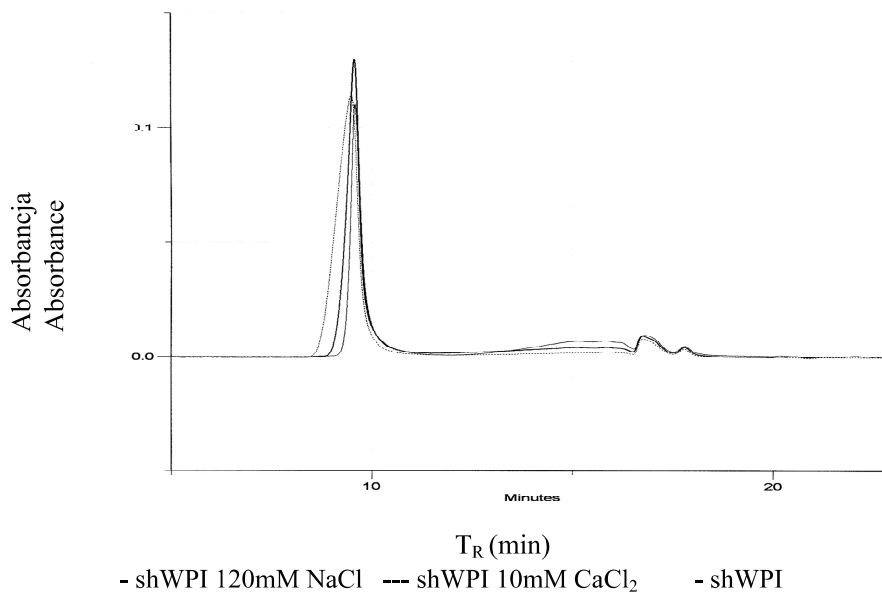
Rys. 2. Zmiany wartości modułu zachowawczego (G') pojedynczo (s) i podwójnie (d) ogrzewanych dyspersji WPI (8% białka) w obecności różnych stężeń chlorku sodu.

Fig. 2. Changes of preservative modulus values (G') of single (s) and double heated (d) WPI dispersions (8% protein) with sodium chloride added at different concentrations.



Rys. 3. Chromatogram 0,1% roztworów WPI.

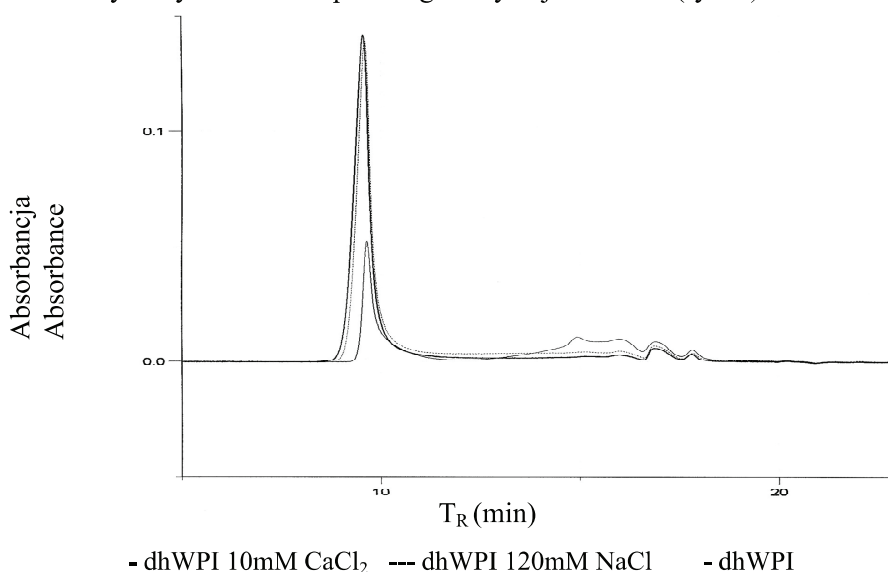
Fig. 3. Chromatograph of 0,1% WPI solutions.



Rys. 4. Wpływ dodatku soli (NaCl) na stopień polimeryzacji białek serwatkowych poddanych pojedynczemu ogrzewaniu.

Fig. 4. The salt (NaCl) addition influence on polymerization of single heated (sh) WPI.

Dodatek soli w ilości 120 mM NaCl lub 10 mM CaCl₂ istotnie wpłynął na stopień polimeryzacji białek serwatkowych, szczególnie w przypadku roztworów poddawanych podwójnemu ogrzewaniu (rys. 4). Otrzymane piki po czasie retencji charakterystycznym dla polimerów/agregatów białek serwatkowych (tj. około 9 min) były wyższe i miały większe pole powierzchni (63 mln w przypadku NaCl i 71 mln po dodaniu CaCl₂) w porównaniu z roztworami poddanymi podwójnemu ogrzewaniu bez dodatku soli. W przypadku pojedynczo ogrzewanych roztworów po dodaniu soli nie zaobserwowano tak wyraźnych zmian w przebiegu krzywej rozdziału (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ dodatku soli (NaCl) na stopień polimeryzacji białek serwatkowych poddanych podwójnemu ogrzewaniu.

Fig. 5. The salt (NaCl) addition influence on polymerization of double heated (dh) whey protein isolates WPI.

Ju i Kilara [8] stwierdzili, że wzrost stężenia NaCl z 20 mM do 200 mM spowodował wzrost twardości żeli, co potwierdziły wcześniejsze badania Nakamury i wsp. [14]. Natomiast większe stężenie NaCl powyżej 400 mM powodowało wolne zmniejszanie twardości [8]. Dodatek CaCl₂ w stężeniu 10 – 20 mM powodował niemalże liniowy wzrost twardości, natomiast większe stężenia soli powyżej 40 mM powodowały spadek twardości żeli. We wcześniejszych badaniach, nad wpływem obecności jonów wapniowych na lepkość roztworów białek serwatkowych poddanych wcześniejszej obróbce termicznej, stwierdzono że optymalne stężenie Ca²⁺ zależy od warunków, w jakich przeprowadzono wstępne ogrzewanie i składu użytego WPI [13]. Barbut i Foegeding [3] zaobserwowali, że wzrost stężenia CaCl₂ (10 – 150 mM) powodował

wzrost naprężenia stycznego podczas zimnego żelowania białek serwatkowych indukowanego jonami wapnia. Dodatek Ca^{2+} do wstępnie ogrzewanych roztworów białek serwatkowych wpływał na zwiększenie intensywności oddziaływań pomiędzy utworzonymi podczas wstępnego ogrzewania polimerami/agregatami, natomiast przy wyższych stężeniach jonów wapniowych stopień agregacji białek serwatkowych wzrastał i wpływał niekorzystnie na równowagę pomiędzy siłami wewnątrz- i zewnątrzcząsteczkowymi i przez to na właściwości reologiczne otrzymanych żeli [13]. Glibowski i wsp. [6] stwierdzili że przy niskim stężeniu jonów wapnia sieć żelowa powstawała przy małym udziale mostków wapniowych, natomiast taki sposób łączenia poszczególnych cząsteczek białka dominował przy wysokich stężeniach jonów wapniowych.

Wnioski

1. Wykorzystanie reometrii oscylacyjnej pozwala na obserwację procesu żelowania bez jednoczesnego niszczenia powstającej sieci żelu.
2. Wartość modułu zachowawczego rosła wraz ze wzrostem stężenia chlorku sodu z 60 do 240 mM, natomiast w przypadku chlorku wapnia z 5 do 15 mM.
3. Pojedyncze ogrzewanie białek serwatkowych powodowało większy stopień polimeryzacji w porównaniu z podwójnym ogrzewaniem.
4. Dodatek NaCl i CaCl_2 wpływał na większy stopień spolimeryzowania białek serwatkowych.

Literatura

- [1] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis (14th Ed.). Arlington, VA 1984.
- [2] Baranyi M., Bosze Z., Buchberger J., Krause I.: Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey cattle: A possible new genetic variant of β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 1993, **76**, 630–636.
- [3] Barbut S.: Foegeding E. Ca^{2+} - induced gelation of pre-heated whey protein isolate. *J. Food Sci.*, 1993, **58**, 867-871.
- [4] Farrell H. M. Jr., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E.: Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 1641–1674.
- [5] Glibowski P., Gustaw W., Mleko S.: Żelowanie zdenaturowanych białek serwatkowych pod wpływem dodatku soli mineralnych. *Przem. Spoż.*, 2002, **5**, 48-50.
- [6] Glibowski P., Mleko S., Wesołowska-Trojanowska M.: Gelation of single heated vs. double heated whey protein isolate. *Inter. Dairy J.*, 2006, **16**, 1113-1118.
- [7] Iametti S., De Gregori B., Vecchio G., Bonomi F.: Modifications occur at different structural levels during heat denaturation of β -lactoglobulin. *Eur. J. Biochem.*, 1996, **237**, 106-112.
- [8] Ju Z., Kilara A.: Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *J. Food Sci.*, 1998, **63** (2), 288-292.
- [9] Ju Z., Kilara A.: Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt and acidulant from, calcium ion-aggregated whey protein isolate. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 1236-1243.
- [10] Leman J.: Funkcjonalne właściwości białek serwatkowych. *Przem. Spoż.*, 1999, **5**, 45-47.
- [11] Leman J., Dołgań T.: Frakcjonowanie białek serwatkowych, *Przem. Spoż.*, 2001, **12**, 41-45.

- [12] Mleko S., Achremowicz B.: Żelowanie koncentratów białek serwatkowych, *Przem. Spoż.*, 1993, **10**, 272-274.
- [13] Mleko S., Glibowski P., Gustaw W., Janas P.: Calcium ions induced gelation of double heated whey protein isolate. *J. Food Sci. Technol.*, 2002, **39** (5), 563-565.
- [14] Nakamura T., Sato K., Koizumi S., Kawachi K., Nishiya T., Nakajima I.: Preparation and properties of salt-induced gels of whey protein. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 1995, **42**, 1-6.
- [15] Prabakaran S., Damodaran S.: Thermal unfolding of β -lactoglobulin: characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 4303-4308.
- [16] Qi X. L., Holt C., McNulty D., Clarke D. T., Brownlow S., Jones G. R.: Effect of temperature on the secondary structure of β -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochem J.*, 1997, **324**, 341-346.
- [17] Relkin P.: Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β -lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 1998, **22**, 59-66.
- [18] Schokker E. P., Singh H., Pinder D. N., Norris G. E., Creamer L. K.: Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at neutral pH. *Inter. Dairy J.*, 1999, **9**, 791-800.

RHEOLOGICAL PROPERTIES AND STRUCTURE OF WHEY PROTEIN ISOLATE POLYMERS

S u m m a r y

One of the most important properties of whey protein is ability to create gels. The pH, ion power of solution, temperature, time of heating, concentration of proteins influence on behaviour of proteins in hydrous solution.

The aim of this study was to investigate the method of heating, concentration of sodium chloride and calcium chloride on rheological properties and chemical structure of whey proteins.

There were two methods of heating the WPI solutions applied. Single heating was led in pH 7,0 in temperature 80°C by 30 min., meanwhile double heating was first in pH 8,0 and after cooling to room temperature, pH was established on level 7,0 then was heated in 80°C by 30 min. The rheological properties of obtained polymers and measured by the HPLC were defined.

Hardness of gels was growing along to the concentration of metals ions. The highest growth of storage modulus was in the case of dispersions with the highest concentration of sodium chloride (120 mM) and calcium chloride (15 mM).

The chromatographic fractionation showed, that the addition of salt influenced on higher polymerization of whey proteins.

Key words: whey protein, rheology, polymerization, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

